

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

«*16 июля*» 2017 г.

Регистрационный № 046-0617



**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ
К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВАМ
HELICOBACTER PYLORI РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: Учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет».
Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская
академия последипломного образования»;

АВТОРЫ: к.м.н., доцент Шевела Т.Л., д.м.н., профессор Походенько-
Чудакова И.О., д.м.н., профессор Костюк С.А.

Минск, 2017

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод определения генетической резистентности *Helicobacter Pylori* (HP) к антибактериальным лекарственным средствам в ротовой жидкости, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику периимплантита, маргинального периодонтита, а также заболеваний слизистой оболочки полости рта.

Инструкция предназначена для врачей - стоматологов, врачей челюстно-лицевых хирургов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь в амбулаторных условиях пациентам с частичной вторичной адентией, заболеваниями маргинального периодонтита, а также заболеваний слизистой оболочки полости рта.

Область применения: стоматология, микробиология

**ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ,
РЕАГЕНТОВ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ
МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ И Т. Д.**

Набор реагентов для выявления ДНК из биологического материала.
Набор реагентов для выявления ДНК *Helicobacter pylori*. Амплификатор, высокоскоростная центрифуга, праймеры и зонды.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

К00.0 Адентия;

К05 Гингивит и болезни пародонта;

К05.0 Острый гингивит;

К05.1 Хронический гингивит;

К05.2 Острый перикоронит;

К05.3 Хронический пародонтит;

К05.3 Хронический пародонтит;
К05.4 Пародонтоз;
К05.5 Другие болезни пародонта;
К05.6 Болезнь пародонта неуточненная;
К10.2 Воспалительные заболевания челюстей;
К10.3 Альвеолит челюстей;
К10.8 Другие неуточненные болезни челюстей;
К12 Стоматит и родственные поражения;
К12.0 Рецидивирующие афты полости рта;
К13.7 Другие и неуточненные поражения слизистой полости рта;
К14 Болезни языка.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Противопоказаний к использованию метода не имеется.

АЛГОРИТМ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА С УКАЗАНИЕМ ЭТАПОВ.

Перед установкой дентальных имплантатов, на втором этапе установки формирователя десневой манжетки, а также при развитии послеоперационных воспалительных осложнений, таких как, мукозит и периимплантит, заболеваний маргинального периодонта, заболеваний слизистой оболочки полости рта.

I этап – качественное выявление ДНК *Helicobacter pylori*

Выделение ДНК из ротовой жидкости проводят стандартным сорбентным методом. При этом к 100 мкл транспортной среды, содержащей клинический материал, в пробирке объемом 1,5 мл (типа Eppendorf), добавляют 300 мкл раствора I (лизирующего, 6 М раствор гуанидина изотиоцианата) и 10 мкл суспензии сорбента (SiO₂). Пробы

инкубируют в течение 5 минут при температуре 65°C, 1-2 раза перемешивают на микроцентрифуге при 1500 оборотов в минуту. Пробы центрифугируют в течение 15 секунд на высокоскоростной микроцентрифуге MPW-55 при 12000 оборотов в минуту, супернатант удаляют. К осадку добавляют 1000 мкл раствора II (промывочного, 96% этанол, содержащий 100 мМ ацетат натрия (pH 4,8)), встряхивают и центрифугируют. Пробирки помещают в твердотельный микротермостат Thermo Block TDB-120 и подсушивали пробы 10 минут при температуре 65°C, оставляют пробирки открытыми. В пробирки с осадком добавляют 100 мкл TE буфера (на 1 л буфера: 0,04 М Трис-ацетат (242 г Трис, 57,1 мл ледяной уксусной кислоты), 0,002 М ЭДТА (100 мл 0,5 М ЭДТА pH 8,0) и инкубируют в течение 5 минут при 65°C. Пробирки центрифугируют в течение 60 секунд при 12000 оборотов. Водную фазу, содержащую раствор нуклеиновых кислот, используют для постановки реакции амплификации.

Амплификацию проводят по следующей программе:

95°C – 5 минут – 1 цикл;
95°C – 20 секунд
60°C – 20 секун } 40 циклов
72°C – 25 секунд

Качественное выявление возбудителя *Helicobacter pylori* осуществляют с использованием тест-системы, с помощью амплификатора-термоциклера. Детекция результатов осуществляют по каналам FAM для *Helicobacter pylori* и JOE – для фрагмента ДНК человека (эндогенный внутренний контроль). Результаты интерпретируют на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией, установленной на уровне

отсутствии) для данной ДНК-мишени значения порогового цикла C_t в соответствующей графе таблицы результатов программного обеспечения прибора.

При получении положительного результата – наличие ДНК возбудителя НР ротовой жидкости проводят этап определения генов устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам.

II этап - выявление tet-гена и erm-гена у Helicobacter pylori

Проводят выявление в ДНК *Helicobacter pylori* ротовой полости tet-гена и erm-гена, по присутствию которых судят о наличии у *Helicobacter pylori* генетической резистентности к антибактериальным лекарственным средствам. Детекцию флуоресценции проводят по следующим каналам: FAM/Green – для tet-гена; ROX/Orange – для erm-гена; VIC/Yellow – для house-keeping гена NAGK. Наличие (или отсутствие) пересечения кривых флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией определяет наличие (или отсутствие) генов устойчивости. При выявлении tet-гена делают заключение о наличии у *Helicobacter pylori* генетической устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам группы тетрациклинов, при выявлении erm-гена о наличии у *Helicobacter pylori* генетической устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам группы макролидов.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Возможные ошибки могут быть связаны с неправильной интерпретацией данных лабораторных исследований, а также нарушений требований этапов хранения и транспортировки биологического материала.